Feel so Bio キットシリーズ

#002 DNA 抽出キット

取扱説明書

1-100-002

目次

本キットの特徴 ･･･ 2

キット使用時に必要な試薬･機材等の一覧 ･･･ 3

内容物について ･･･ 4

事前準備 ･･･ 5

実験手順 ･･･ 6

実験原理 ･･･ 7

ポイント ･･･ 9

実験に際しての注意 ･･･ 9

片付け ･･･ 10

付録 1　DNA について ･･･ 11

本キットの特徴

本キットは、サケの精巣から DNA を抽出するキットで、大量の DNA を効率よく取り出すことが可能です。

生命の設計図「DNA」。地球上に存在する全ての生物は、各々が持つ DNA の情報を基に体をつくり、生きるためのシステムを組み立てています。また、この DNA を受け渡すことで自らの性質を子孫に伝えています。高校生物 I の内容であるメンデル遺伝で学ぶ、概念としての「遺伝子」を実体としての「DNA」とつなげることで、親から子に DNA が受け渡されること、その DNA から形質が生まれることを知り、「遺伝」を実体のあるものとして捉えることができます。

本キットを通じて、DNA を目で見て、手で触れて感じることができます。その体験を通じ、DNA について深く理解するきっかけを得ることが可能です。

キット使用時に必要な試薬・機材等の一覧

キット内容：生徒 20 名対象(4 人 1 班，実験は 2 人 1 組を推奨)

・サケ精巣
・薬さじ　10 本
・フィルター　10 個
・シャーレ　10 個
・撹拌棒　10 本
・NaCl　50 g
・SDS　4.5 g
・取扱説明書 (本書)　1 冊

本キット以外に必要な試薬・機材一覧

・エタノール(99.5%)　400 ml (40 ml×10 組)
・蒸留水　100 ml (10 ml×10 組)
　水道水でも代用できます。
・100 ml ビーカー　40 個(4 個×10 組)
　NaCl 水溶液、エタノール、蒸留水を分注します。また、細胞抽出液を入れるために空のビーカーを用意します。プラスチックコップでも代用できます。
・試験管　10 本
　SDS を分注します。
・恒温槽　1～2 台
　60 °C のお湯を用意するために必要です。

※恒温槽は、弊社で販売およびレンタル(有料)を行っております。ご入用の際にはお問合せください。

内容物について

サケ精巣

サケの精巣は多くの細胞からできており、多量の DNA を含みます。本実験キットでは、サケの精巣から目視するのに十分なDNAを抽出することができます。必ず冷凍保存し、使用直前に常温にて解凍してください。

NaCl (50 g)

500 ml の蒸留水に溶解してご使用ください。また、溶解した水溶液は室温にて保存してください。

SDS (4.5 g)

細胞膜を溶かすための界面活性剤です。45 ml の蒸留水に溶解してご使用ください。室温では溶解しにくいため、60 ℃ 程度で湯煎しながら溶解してください。

※SDS の粉末は目や鼻の粘膜に付着すると危険ですので、吸い込まないよう、注意してご使用下さい。

※溶解した SDS は室温で保存できます。

事前準備

1 班(4 名)分の試薬・機材

サケ精巣	… 約 3mm 角×2 片
薬さじ	… 2 本
シャーレ	… 2 個
撹拌棒	… 2 本
SDS 水溶液	… 4 ml × 2 試験管
NaCl 水溶液	… 40 ml × 2 ビーカー
エタノール(99.5%)	… 40 ml × 2 ビーカー
蒸留水(水道水可)	… 10 ml × 2 ビーカー
100 ml ビーカー	… 1 個

※恒温槽(60 °C)は全体で 1～2 台ご用意ください。

以下の手順に従って試薬を溶解、分注してください。

1)サケ精巣は、実験直前に約 3 mm 角程度に切り取ったものを用意し、配布直前まで冷蔵庫に保存して下さい。

2)NaCl 50 g を 500 ml の蒸留水に溶解し、40 ml ずつビーカーに分け、各班に 2 個ずつ配布します。

3)SDS 4.5g を 45 ml の蒸留水に溶解してください。室温では溶解しにくいため、60 °C 程度のお湯につけながら溶解してください。完全に溶解したら、4 ml ずつ試験管に分け、各班に 2 本ずつ配布します。

4)エタノール(99.5%)を 100 ml ビーカーに 40 ml ずつ分け、各班に 2 個ずつ配布してください。

実験手順

本キットでは、サケの精巣から DNA を抽出します。
※2 人 1 組で行う場合のプロトコルです。

1)サケの精巣約 0.5 g をシャーレにのせ、ペースト状になるまで薬さじですりつぶしてから 10 ml の蒸留水を加え、さらにできる限り均一な白い液体状になるまで薬さじですりつぶします。※筋が残る場合もありますが、その場合は取り除いて実験を進めてください。

2)すりつぶした精巣を、フィルターで漉して空のビーカーに移し、30 ml の蒸留水を加えます。フィルターに残った細胞の塊は軽く薬さじで押さえてビーカーに移してください。

3)上記 2)のビーカーに 10% SDS 水溶液を 4 ml 加え、粘性が出るまでゆっくりと撹拌します。

4)上記 3)のビーカーに NaCl 水溶液を 10 ml 加え、撹拌棒を用いてゆっくりと撹拌します (30 回程度) 。

5)上記 4)のビーカーを 60 °C のお湯で湯煎しながら、粘度が低くなるまでゆっくりと撹拌します(5 分程度かかります)。※火傷にご注意ください。

6)お湯からビーカーを取り出し、30 ml の NaCl 水溶液を加えてゆっくりと撹拌しながら、室温程度まで溶液を冷まします。

7)エタノール(99.5％)を、撹拌棒を伝わらせながら加え、そのままゆらさずに置いておくと1~2 分でエタノールの層(上の層)に白い糸状の DNA が析出してきます。DNA が見えにくいときは、攪拌棒でゆっくりとビーカーをかき混ぜてください(急激に攪拌すると見えにくくなる場合がありますのでご注意ください)。

実験原理

DNA は、細胞の核の中で、タンパク質に保護された状態で存在しています。DNA 抽出は以下の方法で細胞膜とタンパク質を取り除きます。

Step.1　細胞をバラバラにする(手順 1、2)

DNA は細胞の核の中にあります。そのため、DNA を取り出すためには細胞を壊さなければなりません。しかし、動物や植物は多細胞生物とよばれ、たくさんの細胞が集まって体を形作っているので、効率良く細胞を壊すためには、まずこの細胞の塊を崩して細胞をバラバラにする必要があります。そこで実験では、薬さじを用いて精巣をすりつぶし、細胞をバラバラにします。

Step.2　細胞を壊す(手順 3)

細胞は細胞膜とよばれる膜で包まれています。そのため細胞を壊し細胞内の DNA を取り出すためには細胞膜を破る必要があります。細胞膜はリン脂質とタンパク質からできています。リン脂質は疎水性の領域と親水性の領域とをもち、互いに疎水性領域を向き合わせた形で細胞膜を形成しています。ここに界面活性剤である SDS を加えると、リン脂質は乳化され細胞膜が壊れます。

Step.3　DNA とタンパク質を分ける(手順 4 ～ 6)

きれいな DNA を抽出するためには、DNA に結合しているタンパク質を除く必要があります。DNA は負に帯電しており、DNA に結合するタンパク質の DNA 結合領域は正に帯電しています。そのため Na^+イオンを加えることにより、Na^+イオンがタンパク質と競合して DNA に結合するため、タンパク質を除去することができます。

なお、60 °C のお湯で湯煎することでタンパク質が変性し、DNA からタンパク質を除くことができます。この状態で Na^+イオンを加えることで、DNA からできる限り多くのタンパク質を除くことができます。

Step.4　DNA を沈殿させる(手順 7)

Step.3 までは DNA は水に解けている状態のため、目で確認することができません。そこで、エタノールを加えることにより、DNA の周りの水分子が除去され、DNA の析出を助けます。DNA は糸状の白い構造体として現れるため、撹拌棒で巻き取ることができます。

ポイント

1) 実験の各ステップで起こっている現象を生徒にイメージさせながら実験することで、実験原理の理解を深めることができます。

2) 試料をすりつぶす際、始めに水を加えると浮き上がってしまい、つぶしにくくなります。しっかりとつぶしてから水を加え、シャーレの底に張り付いた試料をかき取るのがポイントです。

3) SDS 水溶液や NaCl 水溶液を加えたあとは、ゆっくりと混ぜてください。激しくかき混ぜると、DNA が物理的に切断され、析出しにくくなります。

4) エタノール(99.5％)に細胞抽出液を加える際は、静かに加えてください。激しく加えてしまうと水溶液と混ざりあってしまい、エタノールの濃度が下がり、DNA の析出に必要な濃度以下となり、結果的に DNA が確認できない場合があります。

実験に際しての注意

1) エタノール(99.5％)、SDS 水溶液は触っても安全ですが、万が一、目や口、鼻の粘膜に付いた場合は、すぐに水で洗い、専門医の診断を受けてください。

片付け

1) エタノールは各団体・自治体の指定に従い、廃棄してください。

2) エタノール以外の試薬は水道に流すことができます。

3) 細胞抽出液は粘性が高い場合は水道管が詰まる場合がありますので、フィルターでこしながら水に流してください。

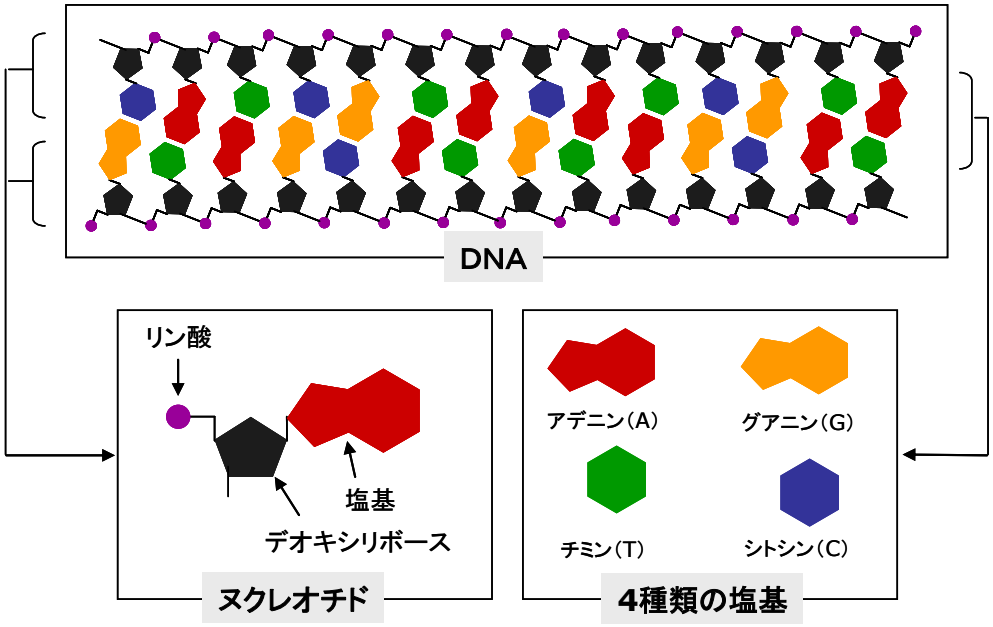
4) 使用した器具は、タンパク質や脂質を落とすために洗剤を使ってしっかりとこすり洗いをしてください。

5) フィルターに残った組織の残骸や抽出した DNA は、生ゴミとして廃棄できます。

付録 1 DNA について

DNA の構造

DNA は、Deoxyribo Nucleic Acid（デオキシリボ核酸）の頭文字を取ったもので、リン酸、デオキシリボースという五炭糖、塩基からなるヌクレオチドという分子が連なった、生体高分子です。下図は、DNA の構造を簡単に表した図です。



塩基にはアデニン・チミン・グアニン・シトシンの 4 種類があり、それぞれ A・T・G・C と略されています。このうち A と T、G と C は水素結合とよばれる弱い結合で結ばれる性質を持っています。図を見ると、A と T、G と C がお互いに結合しあっているのが分かります。このようにして、ヌクレオチドが結合しあって鎖状になった構造が 2 本向かい合い、有名な「二重らせん構造」となるのです。

DNA の働き

DNA がヌクレオチドの連なった構造を持つこと、また 4 種類の塩基からなることは、DNA の働きを考える上で非常に重要です。それは、DNA の塩基の並び方(塩基配列)が、体を構成したり物質の代謝などを行ったりするタンパク質の構造を決めているためです。タンパク質は、20 種類のアミノ酸が連なり、アミノ酸同士の化学的性質によって複雑な構造をとっていま

す。 DNA の塩基配列は、このアミノ酸の並び方を決定しています。

DNA の塩基配列 → アミノ酸の並び方 → タンパク質の構造

塩基配列がアミノ酸の並び方を決定する方法は、暗号解読によく似ています。下の表のように、3 つの塩基でひとつのアミノ酸を決定しており、そのアミノ酸が結合することで、タンパク質がつくられます。

		2番目の塩基									
		T		C		A		G			
1番目の塩基	T	TTT	フェニルアラニン	TCT	セリン	TAT	チロシン	TGT	システイン	T	3番目の塩基
		TTC		TCC		TAC		TGC		C	
		TTA	ロイシン	TCA		TAA	–	TGA	–	A	
		TTG		TCG		TAG		TGG	トリプトファン	G	
	C	CTT	ロイシン	CCT	プロリン	CAT	ヒスチジン	CGT	アルギニン	T	
		CTC		CCC		CAC		CGC		C	
		CTA		CCA		CAA	グルタミン酸	CGA		A	
		CTG		CCG		CAG		CGG		G	
	A	ATT	イソロイシン	ACT	トレオニン	AAT	アスパラギン酸	AGT	セリン	T	
		ATC		ACC		AAC		AGC		C	
		ATA		ACA		AAA	リジン	AGA	アルギニン	A	
		ATG	メチオニン	ACG		AAG		AGG		G	
	G	GTT	バリン	GCT	アラニン	GAT	アスパラギン	GGT	グリシン	T	
		GTC		GCC		GAC		GGC		C	
		GTA		GCA		GAA	グルタミン	GGA		A	
		GTG		GCG		GAG		GGG		G	

しかし、DNA の塩基配列のすべての領域がタンパク質の構造(アミノ酸の並び)を決定しているわけではありません。実際にタンパク質の構造を決定するのは DNA 上の「遺伝子」とよばれる領域のみです。ヒトの場合、DNA は 30 億塩基対からなりますが、その中で遺伝子領域は約 5%程度しか存在しないと考えられています。

サイエンスレスキューFAX問合せ票

ご記入後
03-6277-8042
へご送付ください

＜お客様情報＞

お名前	学校名
ご連絡先：TEL	FAX

＜ご利用いただいたキット＞

キット名	

＜お問い合わせ内容＞

□準備方法について　　□実験方法について
□実験結果について　　□内容物について
□授業での活用方法について　　□その他（　　）

＜お問い合わせ内容について詳細お書きください＞

ご利用ありがとうございます。担当者より追ってご連絡いたします。

Leave a Nest

Feel so Ecoシリーズ　カスタマーサポート係
TEL：03-6277-8041 FAX：03-6277-8042
Mail：ed-kit@leaveanest.com

免責事項

本製品は、バイオ教育を目的として開発されたキットです。本取扱説明書に記載された手順以外でのご使用につき発生したいかなる損害に関して、当社は一切の責任を負いません。

商品のご返品について

商品のご返品につきましては、弊社の確認を必要とさせていただきます。この確認なしでのご返品はご遠慮ください。適切な保存、ご使用をされていない製品についてはご返品をお受けできない場合がございます。また、品質保持のため、返品された製品を再販することは一切ございません。

アフターサポート『バイオレスキュー』

ご購入後3ヶ月間(ご購入月を含む)無料でご利用いただける、アフターサポートサービスです。大学や研究機関等でバイオの研究に携わる、若手研究者が実験手順や先端科学に関する知識面のサポートをいたします。

サポートを担当するのは、リバネスが実施する先端科学実験教室のノウハウを持つスタッフでもありますので、授業内で行う実験カリキュラム等に関するご相談も承っております。気軽にご利用いただけるサービスですので、少しでもご不明な点がございましたら下記までお問い合わせください。

Feel so Bio シリーズ　カスタマーサポート係

TEL：03-6277-8041

FAX：03-6277-8042

Mail：ed-kit@leaveanest.com

※FAX をご利用の場合は、同封の FAX 用紙にご記入の上ご送信ください。

製造・販売元

株式会社リバネス

〒160-0004
東京都新宿区四谷 2-11-6 VARCA 四谷
TEL 03-6277-8041
FAX 03-6277-8042
URL：http://www.leaveanest.com/

Leave a Nest